

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 18 706.8
Anmeldetag: 12. April 2001
Anmelder/Inhaber: Aventis Behring GmbH,
Marburg/DE
Bezeichnung: Diagnostisches Verfahren zum immun-
histochemischen Nachweis der den Blut-
gerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease
IPC: G 01 N 33/573

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 23. Mai 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Brand".

Brand

AVENTIS BEHRING GMBH
ANR 8177007

2001/A008 - A19
Dr. Pfe / JN

**DIAGNOSTISCHES VERFAHREN ZUM IMMUNHISTOCHEMISCHEN
NACHWEIS DER DEN BLUTGERINNUNGSFAKTOR VII AKTIVIERENDEN
PROTEASE**

Die Erfindung betrifft ein diagnostisches Verfahren zum immunhistochemischen Nachweis der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease mit Hilfe von markierten Antikörpern oder deren Fragmenten.

Aus der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 ist eine aus dem Blutplasma isolierte Protease bekannt, die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivieren kann. Auch ein Verfahren zu ihrer Gewinnung, zu ihrem Nachweis und zu ihrer Inaktivierung sowie Arzneizubereitungen, die diese Protease enthalten, sind dort bereits beschrieben. Entsprechend ihren Eigenschaften wird diese Protease als **Faktor Sieben Aktivierende Protease** (= FSAP) bezeichnet. In der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 wird außerdem berichtet, dass die FSAP eine Plasminogen-Aktivatoren aktivierende und/oder verstärkende Wirkung aufweist, die durch die Aktivierung der Einketten-Urokinase (scu PA, single chain urokinase plasminogen activator) oder der Einketten tPA (sctPA, single chain tissue plasminogen activator) gemessen wird.

In der deutschen Patentanmeldung 199 03 693.4 sind auch bereits Verfahren und Testsysteme zum qualitativen und quantitativen Nachweis von FSAP beschrieben, die auf einer Messung, der die Blutgerinnungszeiten verkürzenden Wirkung und der Plasminogen-Aktivatoren aktivierenden Wirkungen von FSAP beruhen. Derartige

Testsysteme erlauben auch die Messung von FSAP in komplexen Proteinlösungen wie Plasma, wie es insbesondere in der deutschen Patentanmeldung 199 26 531.3 beschrieben ist.

In den vorstehend genannten Patentanmeldungen sind auch Testsysteme zur qualitativen und quantitativen Bestimmung sowohl des FSAP-Antigengehalts als auch zur Bestimmung von dessen Aktivität beschrieben. Diese Testsysteme beruhen darauf, dass FSAP durch spezifische monoklonale Antikörper gebunden und/oder detektiert wird, wie es insbesondere in der deutschen Patentanmeldung 100 36 641.4 genauer ausgeführt ist. Dabei haben sich zwei monoklonale Antikörper als besonders effektiv und geeignet erwiesen, die von den Hybridomazelllinien DSM ACC 2453 und DSM ACC 2454 gebildet werden.

Es wurde nun ein diagnostisches Verfahren zum immunhistochemischen Nachweis der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease, ihres Proenzymes oder ihrer Mutanten oder Spaltstücke gefunden, bei dem man auf eine Gewebeprobe einen gegen die Protease gerichteten markierten, monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder eines seiner Fragmente einwirken lässt, den nicht gebundenen Antikörper oder seine Fragmente auswäscht und das von dem gebundenen Antikörper oder einem seiner Fragmente ausgesendete Signal bestimmt.

Das Verfahren kann auch so durchgeführt werden, dass man auf die Gewebeprobe einen gegen die Protease, ihr Proenzym oder seine Mutanten oder Spaltstücke gerichteten unmarkierten monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder eines seiner Fragmente einwirken lässt, den nicht gebundenen Antikörper oder seine Fragmente auswäscht, dann einen markierten anti-Antikörper auf das Gewebe einwirken lässt und nach Auswaschen des nicht gebundenen, markierten anti-Antikörpers das von dem gebundenen anti-Antikörper oder seinen Fragmenten ausgesendete Signal bestimmt.

Es wurde außerdem gefunden, dass gegen FSAP gerichtete monoklonale oder polyklonale Antikörper, wenn sie mit chromophoren oder lumineszierenden Gruppen markiert sind, hervorragend zum Nachweis von FSAP in Gewebeschnitten humanen Ursprungs geeignet sind. Für diesen Nachweis eignen sich polyklonale Antikörper gegen FSAP, die durch Immunisierung von Kaninchen, Schafen, Ziegen oder anderen Säugetieren gewonnen werden, ebenso wie monoklonale Antikörper. Besonders gut geeignet zum histologischen, spezifischen Nachweis von FSAP, die sowohl in der aktivierte Form, als auch in der Proenzymform oder als Spaltstück vorliegen kann, sind die monoklonalen Antikörper der Hybridomazelllinien DSM ACC 2453 und DSM ACC 2454. Auch Komplexe von aktiver FSAP mit Inhibitoren, wie Antiplasmin, können so detektiert werden. Hierfür geeignet sind alle gängigen histologischen Nachweisverfahren wie die Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie.

Zum Nachweis von FSAP in den vorstehend genannten Verfahren eignen sich sowohl die vollständigen polyklonalen und monoklonalen Antikörper als auch deren Fragmente wie $F(ab)_2$ oder $F(ab)$ -Fragmente, sofern sie mit einer detektierbaren Gruppe markiert sind. Dabei können die vorstehend genannten Antikörper oder ihre Fragmente allein oder als Mischung angewendet werden. Das ist besonders dann empfehlenswert, falls eines der erkannten Epitope verdeckt ist. Beispielsweise kann eine Proteindomäne durch Zellassoziation für einen Antikörper nicht zugänglich sein, wird jedoch durch einen anderen Antikörper mit der Spezifität für eine andere FSAP-Region gebunden. Auch Antikörper, die gegen die humane FSAP, deren Wildtyp und/oder gegen deren Mutanten gerichtet sind und die in der deutschen Patentanmeldung 100 52 319.6 näher beschrieben sind, können für den Nachweis von FSAP in Gewebeschnitten humanen Ursprungs eingesetzt werden.

Die bisher gewonnenen Erkenntnisse über den immunhistochemischen Nachweis von FSAP lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- FSAP wird in fast allen der bisher untersuchten humanen Gewebe nachgewiesen;
- Endokrin-aktive Zellen wie die Leydig'schen Zwischenzellen oder die endokrin-aktiven Zellen der Langerhans'schen Inseln der Pankreas lassen sich mit Antikörpern, die chromophore Gruppen tragen, sehr stark intra-zytoplasmatisch anfärben;
- Epithelien und Endothelien zeigen entsprechend ihrer Lokalisation eine mehr oder weniger starke intra-zytoplasmatische Immunreaktion mit Antikörpern gegen FSAP;
- Ganglienzellen und Dendriten der Großhirnrinde zeigen eine hohe Konzentration von FSAP, was durch eine starke immunhistologische Farbreaktion mit chromophoren Antikörpern nachgewiesen wird;
- Plasmazellen zeigen eine intensive intra-zytoplasmatische Verfärbung mit chromophoren Antikörpern;
- mesenchymale Stromazellen zeigen in komplexen Geweben keine oder nur eine schwache Farbreaktion für FSAP.

FSAP ist somit ein Protein, das als ein normaler Zellbestandteil anzusehen ist. Bislang wurde FSAP sowohl intra- als auch extrazellulär lokalisiert gefunden, wobei das erstere Kompartiment deutlich stärker anfärbar ist. Durch die erfindungsgemäße Detektion von FSAP mit den genannten Antikörpern oder ihren Fragmenten können folgende pathologische Vorgänge erkannt werden:

- Endokrin-aktive Tumore und neuro-endokrine Tumore;
- angiogene Endothelien und Endothelien des Kapillarendothels; sowie

- angiogenaktive Tumore wie Gliome und Glioblastome, aber auch beispielsweise Gefäßtumore wie das Hämangioendothelium oder – perizytom und Angiosarkom;
- Wundheilungsreaktionen, Granulationsgewebe und Kollagenosen;
- arteriosklerotische, (mikro)thrombosierte und nekrotisierende Areale;
- neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer'sche Krankheit, Morbus Parkinson aber auch spongiforme Enzephalitiden, beispielsweise ausgelöst durch Prionenproteine;
- Gammopathien und Myelome.

Für den Nachweis der FSAP verwendet man vorzugsweise monoklonale Antikörper der Hybridomazelllinien DSM ACC 2453 oder DSM ACC 2454.

Das erfindungsgemäße diagnostische Verfahren wird durch das nachfolgende Beispiel näher erläutert:

Zur Untersuchung der immunhistochemischen Reaktivität der für FSAP spezifischen monoklonalen Antikörper der Hybridomazelllinien DSM ACC 2453 und DSM ACC 2454 wurden aus adultem humanem Gewebe und malignen urologischen Tumoren 10 µm dicke Paraffinschnitte mit anschließender Endparaffinierung hergestellt, die im Zitratpuffer für 3 mal 5 Minuten in der Mikrowelle behandelt wurden. Auf diese Schnitte ließ man zunächst für 30 Minuten einen unmarkierten Antikörper der oben genannten Hybridomazelllinien einwirken. Nach Auswaschen des Gewebeschnittes ließ man auf das Gewebe einen markierten Anti-Maus-Detektionsantikörper für ebenfalls 30 Minuten einwirken und

machte dann den gebundenen FSAP-Antikörper durch Bildung des APAAP-Komplexes (Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex) und durch Färbung mit Chromogen und Gegenfärbung mit Hämalaun sichtbar.

Als negative Kontrolle wurde in jedem Gewebe separat eine Inkubation mit dem Detektionsantikörper – ohne vorherige Inkubation mit dem FSAP-Antikörper – durchgeführt, um potentielle unspezifische Reaktionen des Detektors sichtbar zu machen. Außerdem wurde als Positivkontrolle ein Antikörper gegen α -Keratin mitgeführt.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung normalen Humangewebes sind in Tabelle 1 zusammengefasst:

Antikörper gegen FSAP, Klon DSMZ ACC2454 und DSMZ ACC 2453

Humanes Normalgewebe

	DSMZ ACC2454	DSMZ ACC2453		2454	2453
Oesophagus			Appendix		
Plattenepithel	2+	2+	Epithelien	1+	3+
Drüsenendstücke	0	0	Muskulatur	1+	1+
Schaltstücke	2+	2+	Lymphfollikel	1+	2+
Muskulatur	1+	1+	Plasmazellen	2+	3+
Stroma	1+	1+-2+	Gefäßendothel	1+	1+
Gefäßendothel	2+	2+	Pankreas		
Kardia (Magen)			Epithelien	1+	2+
Foveolarepithel	0	0	Langerhans-Inseln	3+	1+
Glandulae cardiacae	1+	2+	Gangepithel	2+	2+
Mucinöse Drüsenendstücke	0	0	Gefäßendothel	1+	1+
Belegzellhaltige Drüsen	3+	3+	Speicheldrüse		
Muskulatur	1+	1+	Muköse Endstücke	0	0

Gefäßendothel	1+	1+	Seröse Endstücke	1+	1+-2+
Korpus (Magen)			Schaltstücke	1+	1+
Foveolarepithel	0	0-1+	Streifenstücke	1+	1+
Korpus- Drüsenkörper	2+	2+	Gefäßendothel	0-1+	0-1+
Muskulatur	0	1+	Leber		
Gefäßendothel	1+	1+	Hepatozyten	2+	2+
Duodenum			Gallengänge	0	0
Epithelien	0-1+	1+	Gefäßendothel	1+	(1+)
Brunnersche Drüsen	0	0	Gallenblase		
Muskulatur	0	0-1+	Epithel	1+	1+
Lymphfollikel	1+	2+	Muskulatur	2+	1+
Ganglienzellen	2+	3+	Gefäßendothel	2+	1+
Gefäßendothel	1+	1+	Ductus cysticus		
Dünndarm			Epithel	3+	3+
Epithelien	2+	3+	Muskulatur	2+	1+
Muskulatur	1+	1+	Ganglienzellen	3+	3+
Stroma	1+	2+	Gefäßendothel	2+	2+
Ganglienzellen	3+	3+	Hoden		
Gefäßendothel	1+	1+	Leydigsche Zwischenzellen	3+	1+
Kolon/Rektum			Sertoli-Zellen	1+-2+	1+
Epithelien	1+	1+	Keimzellen	1+-2+	1+
Lymphfollikel	1+	1+	Gefäßendothel	1+	1+
Plasmazellen	1+	1+	Rete testis		
Gefäßendothel	1+	0	Epithel	2+	2+

	2454	2453		2454	2453
Nebenhoden			Plazenta		
Ductus epididymidis	2+	2+	Chorioneipthel	3+	2+
Ductulus efferens	2+	2+	Amnioneipthel	2+	2+
Stroma	1+	1+	Deziduazellen	2+-3+	2+
Gefäßendothel	1+	1+	Stromazellen	0	+/-
Samenblase			Gefäßendothel	1+	1+
Epithel	2+	3+	Eihäute		
Muskulatur	1+	1+	Amnioneipthel	3+	2+
Gefäßendothel	2+	2+	Deziduazellen	3+	1+
Ductus deferens			Fibroblasten	3+	1+-2+
Epithel	2+	3+	Cervix Uteri		

Längsmuskelschicht	0	+-	Drüseneipithel	0	0
Ringmuskelschicht	2+	3+	Gefäßendothel	1+	0-1
Gefäßendothel	2+	3+	Stroma	1+	0-1
Prostata			Tuba uterina		
Drüseneipithel	2+	2+	Epithel	2+	3+
Muskulatur	1+	1+	Muskulatur	0	1+
Gefäßendothel	1+-2+	1+-2+	Gefäßendothel	1+	2+
Niere			Mamma		
Tubuli	2+	1+	Epithelien Brustdrüsennlobuli	2+	2+
Glomerula	0	0	Gangepithel Aus- führungsgänge	2+	2+
Markepithel	1+	1+	Fibroblasten	0	1+
Gefäßendothel	0-1+	0-1+	Plasmazellen	2+	2+
Harnblase			Gefäßendothel	1+	0
Urothel	2+	1+-2+	Schilddrüse		
Muskulatur	2+	1+	Follikelepithel	2+	1+-2+
Plasmazellen	2+	2+	Stroma	1+	1+
Fibroblasten	1+-2+	1+-2+	Gefäßendothel	1+	0
Peripherer Nerv		0	Thymus		
Nebenniere			Hassal-Körperchen	2+-3+	2+
Zona glomerulosa	2+	1+	Follikel	1+	2+
Zona fasciculata	1+-2+	(1+)	Mantelzone	(1+)	(1+)
Zona reticularis	3+	(1+)	Sternhimmelmakropha- gen	1+	1+
Mark	0	0	Milz	+	+
Gefäßendothel	1+	(1+)	Tonsille	+-	+-
Endometrium			Lymphknoten	+-	+-
Drüseneipithel	3+	2+	Kieferhöhle		
Stromazellen	0	1+	Respiratorisches Epithel	2+	2+
Myometrium	1+	1+	Plasmazellen	3+	3+
Gefäßendothel	1+	2+	Gefäßendothel	1+	1+

	2454	2453		2454	2453
Lunge			Fettgewebe	2+	2+
Bronchialepithel	2+	1+	Gefäßendothel	2+	2+
Alveolarepithel	1+-2+	1+	Haut		
Bronchialdrüsen	1+	1+	Epidermis	2+	1+-2+

Knorpel	3+	1+	Dermis	(1+)	0
Muskulatur	1+	1+	Subkutis	(1+)	0
Alveolarmakrophagen	2+	2+	Schweißdrüsen	1+	0
Elastische Fasern	2+-3+	2+-3+	Gefäßendothel	1+	0
Gefäßendothel	1+	1+	Endokard	0	0
Skelettmuskulatur	2+	1+	Fibroblasten	2+-3+	2+-3+

0 = negativ

1+ = schwach positiv

2+ = mäßig stark positiv

3+ = stark positiv

Bei endokrinen Zellen wie den Langerhans'schen Inseln des Pankreas, den Leidig'schen Zwischenzellen des Hodeninterstitiums, bei den Deziduazellen der Plazenta und dem beleghaltigen Drüsenkörper der Magenkardia sowie dem hochzylindrischen Epithel des Ductus cysticus zeigt sich eine starke, teils feingranuläre Reaktion. Stark positive Reaktionen wurden in Gewebeverbänden gelegenen Plasmazellen und gangligen Zellen und den Nervenzellen der Großhirnrinde beobachtet. Auch die dezidualen Zellen, das Amnioepithel, und die Fibroblasten der Eihäute zeigten eine sehr starke immunhistologische Anfärbarkeit, wie auch das auskleidende Epithel der Samenbläschen und die Enterozyten des Dünndarms.

Untersuchungen Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Tumormaterials urologischer Tumoren zeigten eine schwache bis mäßig starke intra-zytoplasmatische Reaktion unterschiedlich differenzierter Adenokarzinome der Prostata. Tumorzellen seminomatöser Hodentumore zeigten nur eine schwache intra-zytoplasmatische Reaktion, während nicht-seminomatöse Tumore (Embryokarzinome und Chorionkarzinome) eine deutlich verstärkte Anfärbarkeit der Tumorzellen aufwiesen, die auf erhöhte Konzentrationen von FSAP hinwiesen.

Das erfindungsgemäße diagnostische Verfahren erlaubt somit einen immunhistochemischen Nachweis von pathologischen Vorgängen in den verschiedensten Organen.

AVENTIS BEHRING GMBH
ANR 8177007

2001/A008 - A19
Dr. Pfe / JN

Patentansprüche:

1. Diagnostisches Verfahren zum immunhistologischen Nachweis der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease, ihres Proenzyms oder ihrer Mutanten oder ihrer Spaltstücke, **dadurch gekennzeichnet**, dass man auf eine Gewebeprobe einen gegen die Protease gerichteten, markierten, monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder eines seiner Fragmente einwirken lässt, den nicht gebundenen Antikörper oder seine Fragmente auswäscht und das von dem gebundenen Antikörper oder einem seiner Fragmente ausgesendete Signal bestimmt.

2. Diagnostisches Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass man auf die Gewebeprobe einen gegen die Protease oder eine seiner Mutanten gerichteten unmarkierten monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder eines seiner Fragmente einwirken lässt, den nicht gebundenen Antikörper oder seine Fragmente auswäscht, dann einen markierten Anti-antikörper auf das Gewebe einwirken lässt und nach Auswaschen des nicht-gebundenen markierten Anti-antikörpers das von dem gebundenen Anti-antikörper oder seinen Fragmenten ausgesendete Signal bestimmt.

3. Diagnostisches Verfahren nach Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die zu untersuchende Gewebeprobe einem endokrinen Organ entnommen ist.
4. Diagnostisches Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass man zum Nachweis der FSAP markierte, monoklonale Antikörper der Hybridomazelllinien DSM ACC 2453 oder DSM ACC 2454 einsetzt.

AVENTIS BEHRING GMBH
ANR 8177007

2001/A008 - A19
Dr. Pfe / JN

Zusammenfassung

**DIAGNOSTISCHES VERFAHREN ZUM IMMUNHISTOLOGISCHEN NACHWEIS
DER DEN BLUTGERINNUNGSFAKTOR VII AKTIVIERENDEN PROTEASE**

Es wird ein diagnostisches Verfahren zum immunhistologischen Nachweis der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease, ihres Proenzymes oder ihrer Mutanten oder Spaltstücke beschrieben, bei dem man auf eine Gewebeprobe einen gegen die Protease gerichteten, markierten, monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder eines seiner Fragmente einwirken lässt, den nicht gebundenen Antikörper oder seine Fragmente auswäscht und das von dem gebundenen Antikörper oder einem seiner Fragmente ausgesendete Signal bestimmt.